

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 413 188 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **90114576.3**

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 39/395**

(22) Anmeldetag: **30.07.90**

(30) Priorität: **17.08.89 DE 3927111**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.02.91 Patentblatt 91/08

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: **BIOTEST PHARMA GMBH**
Landsteiner Strasse 5
D-6072 Dreieich(DE)

(72) Erfinder: **Möller, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.**
Graf-von-Staufenberg-Strasse 32
D-6370 Oberursel(DE)
Erfinder: **Piechaczek, Detlef, Dr. Dipl.-Chem.**
Darmstädter Strasse 54
D-6115 Münster(DE)

(74) Vertreter: **Beil, Hans Chr., Dr. et al**
Beil, Wolff und Beil, Rechtsanwälte
Adelonstrasse 58 Postfach 80 01 40
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) **Nicht modifizierte intravenös verabreichbare IgM- und/oder IgA-haltige Immunglobulinpräparate und Verfahren zu ihrer Herstellung.**

(57) Intravenös verabreichbares, chemisch nicht modifiziertes Immunglobulin-Präparat mit mehr als 5 Gew.% IgM und/oder mehr als 10 Gew.% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, und niedriger antikomplementärer Aktivität und Verfahren zu seiner Herstellung durch Anionenaustauscherchromatographie.

EP 0 413 188 A2

NICHT MODIFIZIERTE INTRAVENÖS VERABREICHBARE IGM- UND/ODER IGA-HALTIGE IMMUNGLOBULIN-PRÄPARATE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

Die Erfindung hat intravenös verträgliche Immunglobulin-Präparate zum Gegenstand, die chemisch nicht modifiziert sind und mehr als 5% IgM und/oder mehr als 10% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthalten, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Die Immunglobuline sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die im Körper als Antwort auf das Auftauchen fremder Antigenen gebildet werden und die für deren Bindung und anschließende Eliminierung zuständig sind. Man unterscheidet mehrere Klassen von Immunglobulinen, wovon aber normalerweise nur IgG, IgA und IgM in höheren Konzentrationen im Plasma gemessen werden.

IgG ist mit ca. 12 mg/ml das Hauptimmunglobulin im Plasma, und hauptsächlich für die Abwehr viraler Infektionen zuständig. Die Konzentration für IgM liegt mit ca. 1,5 mg/ml deutlich niedriger. IgM ist vorwiegend für die Abwehr von bakteriellen Erregern und für die Bindung von Bakterien-Toxinen verantwortlich. IgA ist mit einer durchschnittlichen Plasmakonzentration von 3,5 mg/ml für die Neutralisation von verschiedenen Viren, wie z.B. Poliomyelitis, Masern und Influenza zuständig und in seiner sekretorischen, dimeren Form vor allem in seromukosen Sekreten vertreten.

Für die passive Immuntherapie werden seit nunmehr 40 Jahren Immunglobulin-Präparate eingesetzt. Dabei handelt es sich zum überwiegenden Teil um reine IgG-Präparationen mit nur sehr geringem IgA- und IgM-Gehalt. Bis zum Beginn der sechziger Jahre waren die Immunglobulin-Präparate zudem nur intramuskulär zu applizieren, was wegen der schmerzhaften Nebenwirkungen die Gabe größerer Mengen unmöglich machte.

In der folgenden Zeit wurden dann mehrere intravenös verträgliche IgG-Präparationen entwickelt, indem man das IgG entweder chemisch oder enzymatisch modifizierte oder durch andere Methoden iv-verträglich machte.

IgG-Präparate, die neben dem IgG noch nennenswerte Mengen IgM und/oder IgA enthielten, wie z.B. in der DE-PS 2404265 oder der US-PS 3808189 beschrieben, waren aber weiterhin nur intramuskulär verträglich.

Die ersten und bisher einzigen IgM- und/oder IgA-haltigen intravenös verträglichen Immunglobulin-Präparate sind in der EP-PS 0013901 und der DE-OS 3825429 beschrieben. Die iv-Verträglichkeit wird in diesen beiden Präparaten im wesentlichen durch eine chemische Modifizierung mit β -Propiolakton erreicht. Ein Maß für die iv-Verträglichkeit von Immunglobulinpräparaten ist die Antikomplementäre Aktivität (ACA) gemessen nach Kabat, E. and Mayer, M. in Experimental Immunochimistry 2nd ed., Thomas Brooks, Springfield, Il, 133-240 (1964).

Der Erfindung lag die Aufgabe zu Grunde, IgM- und/oder IgA-haltige Immunglobulinpräparate zu entwickeln, die eine niedrige ACA haben und intravenös verträglich, aber chemisch nicht modifiziert sind.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß man eine IgM-und/oder IgA-haltige Immunglobulinlösung an einen Anionenaustauscher bindet, durch Gradientenelution eine Fraktion mit niedriger ACA eluiert und diese Fraktion gegebenenfalls einer kurzzeitigen Behandlung bei niedrigem pH-Wert und/oder bei erhöhter Temperatur unterzieht.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bei der Anionenaustauschchromatographie die Fraktion, die für die hohe ACA verantwortlich ist, so fest gebunden wird, daß durch geeignete Elutionsbedingungen rund 95% der aufgetragenen Immunglobuline einschließlich der Hauptmenge des IgM und des IgA mit niedriger ACA eluiert werden können.

Verwendet man ein Ausgangsmaterial mit erhöhter ACA, kann man durch zusätzliche kurzzeitige Behandlung dieses Eluates bei niedrigem pH oder erhöhter Temperatur die ACA auf für iv-verträgliche Produkte normale Werte reduzieren.

Ebenfalls überraschend war der Befund, daß bei Verwendung von Ausgangsmaterial mit geringerer ACA unter Umständen die Behandlung des Eluates des Anionenaustauschers bei niedrigem pH und/oder bei erhöhter Temperatur alleine ausreicht, die ACA auf niedrige Werte zu reduzieren, ohne auf einen Teil des IgA und IgM bei der Chromatographie verzichten zu müssen.

Es versteht sich von selbst, daß das Ausgangsmaterial für die Anionenaustauschchromatographie immer unter möglichst Protein-schonenden Bedingungen hergestellt werden muß. Als Ausgangsmaterialien eignen sich Immunglobulin-haltige Lösungen, wie zum Beispiel die Cohn-Fraktion II/III oder III oder andere IgA- und/oder IgM-haltige Plasmafraktionen oder andere Lösungen, wie zum Beispiel Milch oder Milchfraktionen, oder andere Körperflüssigkeiten, oder der Kulturüberstand von IgA und/oder IgM produzierenden Zellen.

Zum Beispiel kann man eine Immunglobulin-haltige Fraktion, wie die Cohn-Fraktion II/III oder III, in Puffer lösen, und die meisten Verunreinigungen durch eine Fällung mit 0,5 bis 5% Oktansäure bei pH 4 bis

6, vorzugsweise pH 5, entfernen. Anschließend wird die Lösung bei niedriger Konduktivität mit einem Anionenaustauscher behandelt, so daß die Hauptmenge des IgA und des IgM gebunden werden. Die Adsorption kann dabei sowohl im Batch-Verfahren, wie auch in einer Chromatographie-Säule oder an Membranen durchgeführt werden.

5 Soll das gewünschte Produkt IgA und IgM enthalten, wird mit einem Salzgradienten derart eluiert, daß ca. 10 bis 20% des IgM auf der Matrix adsorbiert bleiben. Die exakten Elutionsbedingungen sind von der Art des Anionenaustauschers abhängig. Sie bewegen sich aber in dem Bereich von 10 bis 400 mOsmol je nach Matrix und pH-Wert. Einzelheiten für ausgewählte Träger sind in den Beispielen beschrieben.

10 Soll das Produkt nur IgA, aber kein IgM enthalten, wird mit einer niedrigeren Osmolarität eluiert, so daß das IgM an der Matrix adsorbiert bleibt. Je nach Chromatographiebedingungen enthält das Eluat 30 bis 60% IgA neben 70 bis 40% IgG. Die ACA ist in solch einem Produkt auch ohne weitere Behandlung sehr niedrig. Durch geeignete Maßnahmen kann das IgA weiter aufgereinigt werden.

15 Enthält das Eluat dagegen auch nennenswerte Mengen IgM, kann durch eine zusätzliche kurzzeitige Behandlung für 1 Minute bis 24 Stunden bei niedrigem pH, vorzugsweise pH 4 bis 4,5 und/oder bei erhöhter Temperatur, bei 40 bis 60° C, vorzugsweise bei 50 bis 54° C, die ACA weiter reduziert werden.

Eine reine IgM-Lösung, weitgehend befreit von IgA läßt sich gewinnen, indem man den Anionenaustauscher mit Puffer derart vorwäscht, daß das IgA vor dem IgM eluiert wird.

20 Bei niedriger ACA im Ausgangsmaterial kann unter Umständen die gesamte auf dem Anionenaustauscher adsorbierte IgM-Fraktion eluiert werden. In diesem Fall reicht eine kurzzeitige Behandlung des Eluats für 1 Minute bis 4 Stunden bei niedrigem pH, vorzugsweise pH 4 bis 4,5 und/oder bei erhöhter Temperatur, bei 40 bis 60° C, vorzugsweise bei 50 bis 54° C alleine aus, um die ACA auf verträgliche Maße zu reduzieren.

25 Durch Ultra- und Diafiltration kann die Lösung dann konzentriert und im Elektrolytgehalt auf die endgültige iv-Formulierung eingestellt werden. Die ACA der Endprodukte liegt dann in einem Bereich, wie sie für marktübliche iv-IgG-Präparate oder für das chemisch modifizierte IgM-Präparat Pentaglobin üblich sind.

30 Da die ACA der vom Anionenaustauscher nicht gebundenen IgG-Fraktion ebenfalls sehr niedrig ist, kann man aus dieser IgG-Fraktion und den erfindungsgemäßen IgA- und/oder IgM-haltigen Fraktionen Mischungen herstellen, um zu iv-verträglichen Immunglobulinpräparaten mit niedriger ACA und einer gewünschten Verteilung an IgG, IgA und IgM zu gelangen. So läßt sich zum Beispiel ein IgM- und IgA-haltiges Immunglobulin-Präparat mit der gleichen Zusammensetzung wie das Handelsprodukt Pentaglobin mit 80% IgG, 10% IgA und 10% IgM herstellen, wobei die ACA gleich hoch oder sogar niedriger ist, als bei dem durch chemische Modifizierung erhaltenen Pentaglobin.

35 Die erfindungsgemäßen IgM- und/oder IgA-haltigen Immunglobulinpräparate können vor oder nach den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten an sich bekannten Sterilisationsverfahren, wie β -Propiolakton/UV-Behandlung, der Behandlung mit Lösungsmitteln und/oder Detergentien oder der Pasteurisation, unterzogen werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie auf sie zu beschränken:

40

Beispiel 1:

45 10 kg Cohn-Paste III wurden in 50 l 0,1 M Acetatpuffer, pH 5 gelöst und mit 1,5 kg Oktansäure bei 25° C versetzt. Der Niederschlag wurde nach 4 Stunden abzentrifugiert und der Überstand gegen 20 mM Piperazin, 20 mM NaCl, pH 6 diafiltriert. Die Lösung wurde anschließend auf eine 5 l-Säule mit TMAE-Fraktogel (Firma Merck, Darmstadt), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war, in 5 Chromatographie-Läufen aufgetragen. Die IgG-Fraktion, die dabei nicht gebunden wurde, wurde gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert.

50 Mit 20 mM Piperazin, 100 mM NaCl, pH 6 ließ sich eine IgA-reiche Fraktion und anschließend mit 20 mM Piperazin, 150 mM NaCl, pH 6 eine IgM-reiche Fraktion eluieren. Mit 20 mM Piperazin, 190 mM NaCl, pH 6 wurde dann das restliche gebundene Protein von der Säule gewaschen.

Tabelle 1 gibt die Zusammensetzung und die ACA der Fraktion wieder.

55

Tabelle 1:

	IgG	IgA	IgM	ACA
	g/l	g/l	g/l	CH 50/ml
IgG-Fraktion	50	0,3	0	9
IgA-Fraktion	31	18	0,1	17
IgM-Fraktion	9	9	31	41
Restfraktion	8	3	39	441

Aus den IgG-, IgA- und IgM-Fractionen dieses Beispiels wurde durch entsprechendes Mischen ein chemisch unmodifiziertes Immunglobulinpräparat mit der Zusammensetzung 80% IgG, 10% IgA und 10% IgM hergestellt und mit dem β -propiolaktom-modifizierten Handelsprodukt Pentaglobin verglichen (Tabelle 2).

Tabelle 2:

	IgG	IgA	IgM	ACA
	g/l	g/l	g/l	CH 50/ml
unmodifiziertes Präparat (erfindungsgemäß)	40,0	4,9	5,0	13
Pentaglobin Lot 1462019 (Vergleich)	43,4	4,2	5,0	26

Beispiel 2:

1 kg Cohn-Paste III wurde analog zu Beispiel 1 aufgearbeitet. Nach dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule wurde gleich mit 20 mM Piperazin, 160 mM NaCl, pH 6 eluiert. Die Fraktion enthielt 50% IgG, 23% IgA und 27% IgM bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt. Die ACA betrug 26 CH 50/ml.

Beispiel 3:

1 kg Cohn-Paste III wurde analog zu Beispiel 1 behandelt und auf eine 2 l Säule QMA-Accell in 2 Läufen aufgetragen. Nach dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule wurde gleich mit 20 mM Piperazin, 20 mM NaCl, pH 4,7 eluiert. Die Fraktion enthielt 38% IgG, 27% IgA und 35% IgM bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt. Die ACA betrug CH 50/ml. Durch eine Behandlung für 30 Minuten bei pH 4,0 ließ sich die ACA auf 20 CH 50/ml reduzieren.

Beispiel 4:

10 kg Cohn-Paste II/III wurde analog zu Beispiel 1 aufgearbeitet. Wegen des höheren IgG-Gehaltes der Paste II/III gegenüber der Paste III wurde die Oktansäuremenge auf 0,75 kg reduziert. In der Tabelle 3 sind die Eigenschaften der Eluate wiedergegeben.

Tabelle 3:

	IgG	IgA	IgM	ACA
	g/l	g/l	g/l	CH 50/ml
IgG-Fraktion	49	1	0	4
IgA-Fraktion	35	15	0,2	7
IgM-Fraktion	9	10	30	19
Restfraktion	10	4	36	193

Beispiel 5:

1 kg Cohn-Paste III wurde analog zu Beispiel 1 aufgearbeitet. Nach dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule wurde mit 20 mM Piperazin, 120 mM NaCl, pH 6 gewaschen und mit 20 mM Piperazin, 175 mM NaCl, pH 6 eluiert. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration konzentriert und durch Diafiltration auf einen Proteinwert von 50 g/l in 75 mM NaCl, 2,5% Glukose, pH 7 eingestellt. Das Produkt wurde sterilfiltriert, für 20 Minuten auf 50° C erhitzt und anschließend gefriergetrocknet. Das Immunglobulin-Präparat hatte die in Tabelle 4 aufgeführten Eigenschaften.

Tabelle 4

	Protein	IgM	ACA	rez. Titer ²⁾
	g/l	g/l	CH 50/ml	Pseudom. aerug.
IgM-Präparat (erfindungsgemäß) nach der Chromatographie nach 20 Min., 50° C	54,3	50,5	230	40960
nach der Gefriergetrocknung ¹⁾	54,3	50,5	29	40960
Vergleichspräparat: Pentaglobin Lot 1462019	50,7	46,5	27	40960
	53,3	5,0	26	1280

¹⁾ Rekonstitution mit destilliertem Wasser

²⁾ Der antibakterielle Titer gegen *Pseudomonas aeruginosa* wurde nach der Methode der passiven Hämagglutination nach Neter, E, Bact. Rev. 20, 166 (1956) bestimmt.

Beispiel 6:

6 kg Cohn-Paste III wurde analog zu Beispiel 1 aufgearbeitet. Nach dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule wurde bei jedem der 3 Läufe mit 20 mM Piperazin, 120 mM NaCl, pH 6 gewaschen und mit 20 mM Piperazin, 175 mM NaCl, pH 6 eluiert. Die 3 IgM-Eluate wurden vereinigt und von den erhaltenen 12 l Eluat 3 l analog zu Beispiel 5 aufgearbeitet.

Die restlichen 9 l wurden in einer Rotationsdurchflußapparatur mit 2 x 20 W UV-Lampen bei 600 UPM und einem Durchfluß von 20 l pro Stunde in 1 cm Abstand bestrahlt.

Nach der Konzentrierung durch Ultrafiltration auf 40 g/l Protein wurde die Hälfte der Lösung mit 0,05 % β -Propiolakton (β PI) für 90 Minuten bei pH 7,2 und 25° C behandelt.

Die andere Hälfte der Lösung wurde für 4 Stunden bei 25° C mit 0,3 % Tri-N-Butylphosphat (TNBP) und 1% Tween 80 behandelt. Anschließend wurde in beiden Fällen wie in Beispiel 5 weiterverfahren.

Die Präparate wurde auf gleichen Protein- und IgM-Gehalt eingestellt, die ACA und der antibakterielle Titer sind in der folgenden Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5:

	ACA	rez. Titer
	CH 50/ml	Pseud. aerug.
ohne Sterilisation	32	20480
nach UV/ β PI	30	20480
nach UV/TNBP-Tween	31	20480

Unter den gewählten Bedingungen, die die Gewähr für eine ausreichende Inaktivierung humanpathogener Viren bieten, werden weder die ACA noch die antibakterielle Wirksamkeit des IgM-Präparates nennenswert verändert.

Die erfindungsgemäßen Immunglobulin-Präparate, die sowohl als gegebenenfalls noch zu verdünnende injizierbare Lösungen oder in gefriergetrockneter Form bereitgestellt werden können, können zusätzlich Proteine, wie beispielsweise Humanalbumin, Zucker, wie beispielsweise Glucose, oder Aminosäuren oder geeignete monoklonale Antikörper zugesetzt werden.

Ansprüche

1. Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - a) mehr als 5 Gew.-% IgM und/oder mehr als 10% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält,
 - b) chemisch unmodifiziert ist und
 - c) eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweist.
2. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zwischen 5 und 100 Gew.% IgM, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
3. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zwischen 10 und 100 Gew.% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
4. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 35 Gew.-% IgM und 10 bis 35 Gew.-% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
5. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1 bis 20 g/100 ml, vorzugsweise 3 bis 5 g/100 ml vorliegt.
6. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es gefriergetrocknet ist.
7. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Glucose, oder Aminosäuren enthält.
8. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich monoklonale Antikörper enthält.
9. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt, diesen mit einem Salzgradienten in einer Weise eluiert, daß Proteine mit einer hohen antikomplementären Aktivität gebunden bleiben und die Immunglobuline im Eluat eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweisen.
10. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man gegebenenfalls vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden, vorzugsweise 20 bis 40 Minuten auf 40 bis 60° C, vorzugsweise 50 bis 54° C erhitzt.
11. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach Anspruch 9 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung gegebenenfalls vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher für 1 Minute bis 24 Stunden bei pH 3,5 bis 5, vorzugsweise pH 4 bis 4,5 inkubiert.
12. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt, gebundenes IgA und/oder IgM eluiert und die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden, vorzugsweise 20 bis 40 Minuten auf 40 bis 60° C, vorzugsweise 50 bis 54° C erhitzt.
13. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt,

- gebundenes IgA und/oder IgM eluiert und die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden bei pH 3,5 bis 5, vorzugsweise pH 4 bis 4,5 inkubiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man starke Anionenaustauscher verwendet.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher TMAE-Gruppen tragende Polymere verwendet.
16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher QMA-Gruppen tragende Polymere verwendet.
17. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher QAE-Trisacryl, Q-Sepharose oder MonoQ verwendet.
- 10 18. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man schwache Anionenaustauscher verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher DEAE-Gruppen-tragende Polymere, z.B. DEAE-Trisacryl verwendet.
- 15 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial Immunglobulin-haltige Lösungen, wie die Cohn-Fraktion II/III oder III oder andere IgA- und/oder IgM-haltige Plasmafraktionen oder andere Lösungen, wie zum Beispiel Milch oder Milchfraktionen, oder andere Körperflüssigkeiten oder Kulturüberstand von IgA und/oder IgM produzierenden Zellen verwendet.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß vor oder nach der
- 20 Behandlung mit dem Anionenaustauscher in der Lösung vorhandene Viren durch geeignete Maßnahmen inaktiviert werden.
22. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher in der Lösung vorhandene Viren mit β -Propiolakton und/oder UV-Bestrahlung, durch Behandlung mit Lösungsmitteln und/oder Detergentien oder
- 25 durch Pasteurisation in Lösung inaktiviert werden.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaaten ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung eines intravenös verabreichbaren polyklonalen, chemisch unmodifizierten Immunglobulin-Präparates, enthaltend mehr als 5 Gew.-% IgM und/oder mehr als 10% IgA, bezogen auf
- 30 den Gesamtimmunglobulingehalt, sowie eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweisend, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt, diesen mit einem Salzgradienten in einer Weise eluiert, daß Proteine mit einer hohen antikomplementären Aktivität gebunden bleiben und die Immunglobuline im Eluat eine niedrige antikomplementäre Aktivität
- 35 aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat zwischen 5 und 100 Gew.-% IgM, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat zwischen 10 und 100 Gew.-% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
- 40 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat 10 bis 35 Gew.-% IgM und 10 bis 35 Gew.-% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat als Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1 bis 20 g/100 ml, vorzugsweise 3 bis 5 g/100 ml, vorliegt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat
- 45 gefriergetrocknet ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat zusätzlich Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Glucose, oder Aminosäuren enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das hergestellte Immunglobulinpräparat
- 50 zusätzlich monoklonale Antikörper enthält.
9. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man gegebenenfalls vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden, vorzugsweise 20 bis 40 Minuten, auf 40 bis 60 °C, vorzugsweise 50 bis 54 °C, erhitzt.
10. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung gegebenenfalls vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher für 1 Minute bis 24 Stunden bei pH 3,5 bis 5, vorzugsweise pH 4 bis 4,5, inkubiert.
11. Verfahren zur Herstellung von chemisch unmodifizierten, intravenös verabreichbaren Immunglobulinprä-

- paraten, enthaltend mehr als 5 Gew.-% IgM und/oder mehr als 10% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, sowie eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweisend, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt, gebundenes IgA und/oder IgM eluiert und die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden, vorzugsweise 20 bis 40 Minuten, auf 40 bis 60° C, vorzugsweise 50 bis 54° C, erhitzt.
12. Verfahren zur Herstellung von chemisch unmodifizierten, intravenös verabreichbaren Immunglobulinpräparaten, enthaltend mehr als 5 Gew.-% IgM und/oder mehr als 10% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, sowie eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweisend, dadurch gekennzeichnet, daß man eine immunglobulinhaltige Lösung mit einem Anionenaustauscher behandelt, gebundenes IgA und/oder IgM eluiert und die Lösung für 1 Minute bis 24 Stunden bei pH 3,5 bis 5, vorzugsweise pH 4 bis 4,5, inkubiert.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man starke Anionenaustauscher verwendet.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher TMAE-Gruppen tragende Polymere verwendet.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher QMA-Gruppen tragende Polymere verwendet.
16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher QAE-Trisacryl, Q-Sepharose oder MonoQ verwendet.
17. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man schwache Anionenaustauscher verwendet.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher DEAE-Gruppen-tragende Polymere, z.B. DEAE-Trisacryl verwendet.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial Immunglobulin-haltige Lösungen, wie die Cohn-Fraktion II/III oder III oder andere IgA- und/oder IgM-haltige Plasmafraktionen oder andere Lösungen, wie zum Beispiel Milch oder Milchfraktionen, oder andere Körperflüssigkeiten oder Kulturüberstand von IgA und/oder IgM produzierenden Zellen verwendet.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher in der Lösung vorhandene Viren durch geeignete Maßnahmen inaktiviert werden.
21. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß vor oder nach der Behandlung mit dem Anionenaustauscher in der Lösung vorhandene Viren mit β -Propiolakton und/oder UV-Bestrahlung, durch Behandlung mit Lösungsmitteln und/oder Detergentien oder durch Pasteurisation in Lösung inaktiviert werden.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 413 188 A3**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: **90114576.3**

⑤① Int. Cl.⁵: **A61K 39/395**

⑳ Anmeldetag: **30.07.90**

③① Priorität: **17.08.89 DE 3927111**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.02.91 Patentblatt 91/08

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑥⑧ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **05.06.91 Patentblatt
91/23**

⑦① Anmelder: **BIOTEST PHARMA GMBH**
Landsteiner Strasse 5
W-6072 Dreieich(DE)

⑦② Erfinder: **Möller, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.**
Graf-von-Staufenberg-Strasse 32
W-6370 Oberursel(DE)
Erfinder: **Piechaczek, Detlef, Dr. Dipl.-Chem.**
Darmstädter Strasse 54
W-6115 Münster(DE)

⑦④ Vertreter: **Beil, Hans Chr., Dr. et al**
Beil, Wolff und Beil, Rechtsanwälte
Adelonstrasse 58 Postfach 80 01 40
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

⑤④ **Nicht modifizierte intravenös verabreichbare IgM- und/oder IgA-haltige Immunglobulinpräparate und Verfahren zu ihrer Herstellung.**

⑤⑦ Intravenös verabreichbares, chemisch nicht modifiziertes Immunglobulin-Präparat mit mehr als 5 Gew.% IgM und/oder mehr als 10 Gew.% IgA, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, und niedriger antikomplementärer Aktivität und Verfahren zu seiner Herstellung durch Anionenaustauscherchromatographie.

EP 0 413 188 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 4576

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
Y	FR-A-2433342 (BLUTSPENDEDIENST DER LANDESVERBANDE DES DEUTSCHEN ROTEN KREUZES....) * Seiten 3 - 4 *	1-22	A61K39/395
Y	FR-A-2314730 (BIOTEST-SERUM-INSTITUT) * Seiten 2 - 3 *	1-22	
Y,D	EP-A-13901 (BIOTEST-SERUM-INSTITUT) * Ansprüche 1-4 *	1-22	
A	EP-A-268973 (BIOTEST PHARMA) * das ganze Dokument *	1-22	
A	DE-A-3310150 (LENTIA) * das ganze Dokument *	1-22	
A,D	DE-A-2404265 (BEHRINGWERKE) * das ganze Dokument *	1-22	
A,D	US-A-3808189 (BREUER C.B.) * das ganze Dokument *	1-22	
A,P	EP-A-352500 (BIOTEST PHARMA) * das ganze Dokument *	1-22	
D	& DE-A-3825429 -----		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	21 MAERZ 1991	AVEDIKIAN P. F.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			